

Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Abteilung Klinische Pharmakologie
Direktor (kommissarisch): Univ. Prof. Dr. med. Ralf Stahlmann

„Charakterisierung
von renalen Endorganschäden bei der
salzsensitiven spontanen
Hypertonie im Rattenmodell“

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von
Peter Koßmehl
aus Wolgast

Referent: Prof. Dr. med. R. Kreutz

Korreferent: Prof. Dr. med. J. Jordan

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 02.12.2005

meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die primäre Hypertonie und ihre Folgeerkrankungen	1
1.2 Tiermodelle zur Untersuchung der Herz-Kreislauf-Erkrankungen	4
1.3 Ratten-Inzuchtstämme mit salzsensitiver und salzresistenter spontaner Hypertonie	6
1.4 Der experimentelle Nachweis krankheitsassoziierter Gene bei der primären Hypertonie	7
1.5 Die Identifizierung genetischer Faktoren bei dem salzresistenten Tiermodell SHR und den salzsensitiven Tiermodellen SHRSP sowie Dahl/SS/Jr, die zu einer arteriellen Hypertonie mit renalen Endorganschäden führen	8
1.6 Ziel der Arbeit	10
2 MATERIAL UND METHODEN	12
2.1 Material	12
2.1.1 Chemikalien und Radionukleotide	12
2.1.2 Enzyme	13
2.1.3 Puffer und Lösungen	13
2.1.4 Sonstige Materialien und Futtermittel	13
2.1.5 Geräte	14
2.2 Methoden	15
2.2.1 Haltung	15
2.2.2 Zucht	15
2.2.2.1 Parentaltiere	15
2.2.2.2 F2-Paarungspopulationen	15
2.2.3 Versuchsprotokoll	16
2.2.4 Phänotypische Charakterisierung	16
2.2.4.1 Blutdruckmessung	16
2.2.4.2 Untersuchung im metabolischen Käfig	16
2.2.4.3 Messung der Albuminexkretion	17

2.2.4.4	Präparation	18
2.2.5	Histologie	18
2.2.5.1	Paraffineinbettung der Organe	18
2.2.5.2	Schneiden und Färben der Nieren	18
2.2.6	Semiquantitative Bewertung und morphometrische Bildanalyse	19
2.2.6.1	Semiquantitative Bewertung der Glomerulosklerose in der Niere	19
2.2.6.2	Morphometrische Bildanalyse der interstitiellen Fibrose in der Niere	20
2.2.7	Genotypisierung	22
2.2.7.1	Genom-Analyse mittels polymorpher Mikrosatellitenmarker	22
2.2.7.1.1	Isolierung genomischer DNA	22
2.2.7.1.2	Präparation der DNA-Vorratsplatten	23
2.2.7.1.3	Primer und Primerlabeling	23
2.2.7.1.4	PCR (Polymerase-Kettenreaktion)	23
2.2.7.1.5	Polyacrylamidgel – Elektrophorese	24
2.2.7.2	Genomweite Kopplungsanalyse der F2-Paarungspopulation	25
2.2.7.3	Kosegregation und statistische Analyse	25
2.2.7.3.1	Kosegregation	25
2.2.7.3.2	Statistische Analyse	27
3	ERGEBNISSE	28
3.1	Parentalstamm-Charakterisierung	28
3.1.1	Phänotypisierung der Parentalstämme SHR/Mol, SHRSP und Dahl/SS/Jr	28
3.1.1.1	Phänotypische Charakterisierung und Untersuchung auf Salzsensitivität	28
3.2	Kosegregationsanalyse	33
3.3	Die Geno- und Phänotypen-Effekte	37
4	DISKUSSION	42
4.1	Zusammenfassung und Ausblick	50
5	ABKÜRZUNGEN	52
6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	54
7	LITERATUR	56
8	ANHANG	60
8.1	Danksagung	60

8.2	Publikationen -----	62
8.3	Auszeichnungen -----	65
8.4	Lebenslauf -----	66
8.5	Eidesstattliche Erklärung -----	68

Zusammenfassung

Die Pathogenese der primären arteriellen Hypertonie ist derzeit immer noch ungeklärt. Die Untersuchungsergebnisse an Tiermodellen sowie klinische Daten zeigen, dass die primäre Hypertonie nicht durch einen einzigen, für eine große Gruppe von Patienten gültigen Pathomechanismus beschrieben werden kann, sondern dass es sich um eine Erkrankung handelt, die durch verschiedene Umwelteinflüsse im Wechselspiel mit einer genetischen Disposition ausgelöst wird. Diese Arbeit verdeutlicht die komplexen Zusammenhänge in einem klar definierten Tiermodell zur Charakterisierung von renalen Endorganschäden bei der salzsensitiven spontanen Hypertonie. Bei der Planung dieser Arbeit lag das Ziel in der Identifizierung genetischer Faktoren, die sowohl blutdruckabhängig als auch blutdruckunabhängig zur Entwicklung einer salzsensitiven Hypertonie sowie der Nierenschädigung führen. Hierbei lag der Schwerpunkt in der Etablierung und Beschreibung einer bildanalytischen Methode zur Quantifizierung der fibrotischen Veränderungen in der Niere. Da die genetische Heterogenität der Menschen sowie eine Vielzahl individueller, nicht definierbarer Umwelteinflüsse für die Identifizierung der genetischen Faktoren nur bedingt geeignet sind, mussten für die Fragestellung genetisch homogene Inzuchtrattenstämme, ein salzresistenter SHR-Stamm und zwei salzsensitive Stämme, charakterisiert werden. Anschließend wurden aus diesen Tierstämmen die F2-Populationen SHR/Mol x SHRSP und SHR/Mol x Dahl/SS/Jr gezüchtet und hinsichtlich der unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber Salz im Rahmen einer Kosegregationsanalyse phänotypisch und genotypisch untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine unterschiedliche Bedeutung der salzsensitiven Hypertonie für die Entwicklung der Nierenschädigung. Bei der SHR/Mol x SHRSP-Population fand sich eine signifikante Korrelation zwischen systolischem Blutdruck und der Albuminexkretion ($r^2=0,47$, $p<0,001$) sowie zwischen systolischem Blutdruck und der strukturellen Nierenschädigung. So erklärte die Blutdruckvarianz bei der SHR/Mol x SHRSP-Kohorte 47% der Albuminexkretion, 33% der Glomerulosklerose und 23% der renalen interstitiellen Fibrose. Im Gegensatz dazu fand sich bei der SHR/Mol x Dahl/SS/Jr-Kreuzung allenfalls eine schwache Korrelation zwischen systolischem Blutdruck und Albuminexkretion ($r^2=0,15$, $p<0,001$). Zwischen systolischem Blutdruck und struktureller Nierenschädigung bestand keine signifikante Korrelation.

Diese Befunde belegen, dass bei der Dahl- salzsensitiven Ratte blutdruckunabhängige genetische Faktoren eine größere Bedeutung für die Manifestation der renalen Endorganschäden haben als bei der SHRSP-salzsensitiven Ratte. Bei diesem Inzuchtstamm ist die salzsensitive Hypertonie entscheidend für die Manifestation der Nierenschädigung verantwortlich. Dieser Befund wurde anhand des identifizierten Blutdruck-QTL auf dem

Rattenchromosom 1 beispielhaft dargestellt. An diesem Genort besteht eine signifikante Kopplung sowohl zum systolischen Blutdruck und der Albuminexkretion sowie zur Glomerulosklerose und der renalen interstitiellen Fibrose. Hieraus kann abgeleitet werden, dass die Nierenschädigung eine sekundäre Folge des Blutdruckanstiegs an diesem QTL ist.